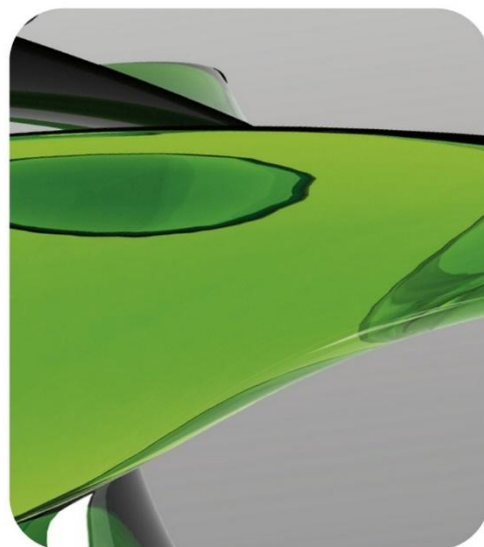




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA® DGP-G

Ref 3514



Οδηγίες χρήσης

Περιεχόμενα

1	Ενδεδειγμένη χρήση	1
2	Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου	1
3	Συστατικά στοιχεία που περιέχονται στο σετ	2
4	Φύλαξη και χρόνος διατήρησης.....	2
5	Υποδείξεις και προφυλάξεις	3
6	Λήψη δείγματος, προετοιμασία και φύλαξη	4
7	Διαδικασία της μεθόδου	4
8	Ποσοτική και ποιοτική ερμηνεία	7
9	Τεχνικά στοιχεία.....	8
10	Στοιχεία Απόδοσης	8
11	Βιβλιογραφία.....	11
12	Ρυθμιστικά σύμβολα	12



Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

1 Ενδεδειγμένη χρήση

AESKULISA® DGP-G είναι μια ενζυμοανοσολογική μέθοδος στερεής φάσης, η οποία χρησιμοποιεί συνθετικά πεπτίδια που προέρχονται από απαμινωμένη γλιαδίνη για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG έναντι των πεπτιδίων απαμινωμένης γλιαδίνης (DGP) στον ανθρώπινο ορό.

Η ανάλυση είναι ένα εργαλείο για τη διάγνωση της νόσου κοιλιοκάκης (εντεροπάθεια λόγω δυσανοχής στη γλουτένη).

2 Κλινική εφαρμογή και αρχές της μεθόδου

Η εντεροπάθεια από γλουτένη ή κοιλιοκάκη χαρακτηρίζεται από ατροφία των λαχνών του λεπτού εντέρου, με αποτέλεσμα την «επιπέδωση» των λάχνων του εντερικού βλεννογόνου. Αιτία της ασθένειας είναι μία παθολογική δυσανεξία στη γλιαδίνη. Η γλιαδίνη είναι το διαλυτό σε αλκοόλη τμήμα της γλουτένης, ενός συστατικού στοιχείου του σιταριού, της σίκαλης και του κριθαριού.

Η ασθένεια επάγεται με τη λήψη γλουτένης. Ως θεραπεία πρέπει να διατηρείται εφ' όρου ζωής μία ελεύθερη σε γλουτένη διαίτα, διότι τα συμπτώματα εμφανίζονται πάντοτε όταν λαμβάνεται εκ νέου γλουτένη. Η κοιλιοκάκη συσχετίζεται με το HLA, >95% των ασθενών κωδικοποιούν το DQ2 με DQA1*0501 και DQB1*0201. Η νόσος είναι δυνατό να εκδηλωθεί σε όλες τις ηλικίες, ωστόσο όμως εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στην πρώιμη παιδική ηλικία, εν μέρει ήδη σε νεογνά. Η συχνότητά της ανέρχεται σε 1/4000 έως και 1/300 στην Ευρώπη.

Η διάγνωση τίθεται τελικά μέσω της βιοψίας του λεπτού εντέρου, όπου ανευρίσκεται το κλασσικό «επίπεδο» βλεννογόνο, συνοδευόμενη από δείκτες ορού. Τα αντισώματα έναντι της γλιαδίνης και της ιστικής τρανσγλουταμίνης (tTG) έχουν αποκτήσει εδώ ιδιαίτερη σημασία. Η tTG έχει αναγνωριστεί ως αντιγόνο – στόχος των EMA.

Πρόσφατες εργασίες έχουν αποδείξει ότι τα αντισώματα που αντιδρούν στη γλιαδίνη από ασθενείς που πάσχουν από κοιλιοκάκη δεσμεύουν έναν πολύ περιορισμένο αριθμό συγκεκριμένων επιτόπων στο μόριο της γλιαδίνης.^{7,8} Η επιλεκτική απαμίνωση της γλιαδίνης από την τρανσγλουταμίνση ιστού προκαλεί ενισχυμένη δέσμευση από τα αντισώματα αντι-γλιαδίνης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν απαμινωμένα και καθορισμένα πεπτίδια έχουν αποδείξει ότι παρέχουν υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια για τη νόσο κοιλιοκάκη σε σύγκριση με τις τυπικές μεθόδους αντι-γλιαδίνης.^{9, 10, 11}

Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων IgG κατά της γλιαδίνης (και/ή tTG) έχει ιδίως υψηλή τιμή καθώς περίπου το 2% - 5% των ασθενών που πάσχουν από κοιλιοκάκη παρουσιάζουν έλλειψη IgA, συνεπώς δεν ανιχνεύονται στις δοκιμασίες υποκατηγορίας IgA

Επιπλέον, τα αντισώματα κατά της γλιαδίνης και του DGP μπορεί να αποτελούν το μοναδικό ορολογικό δείκτη στα νεογνά, καθώς τα αντισώματα anti-tTG και EMA δεν υπάρχουν σε αυτή την ηλικία.

Αρχές της δοκιμασίας

Τα διαλυμένα 1:101 δείγματα ορού επωάζονται στις μικροπλάκες, οι οποίες είναι επικαλυμμένες με το ειδικό αντιγόνο. Κατά τη διάρκεια της επώασης συνδέονται τα ειδικά αντισώματα από τον ορό των ασθενών, εάν αυτά υπάρχουν, με το αντιγόνο που βρίσκεται στην πλάκα, τα μη συνδεδεμένα στοιχεία του ορού απομακρύνονται στο επόμενο βήμα πλύσης. Έπειτα προσθέτονται αντι-ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με υπεροξειδάση από ραφανίδα (σύζευγμα). Κατά τη διάρκεια μίας επώασης, το σύζευγμα (συζευγμένες ανοσοσφαιρίνες) συνδέεται με το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος που σχηματίστηκε πριν, οι μη συζευγμένες ανοσοσφαιρίνες απομακρύνονται στο επόμενο βήμα πλύσης. Η διαπίστωση των συνδεδεμένων αντισωμάτων πραγματοποιείται με ενζυματική χρωστική αντίδραση (μπλε) του υποστρώματος, η οποία αναστέλλεται με διαλυμένο οξύ (αλλαγή χρώσης σε κίτρινο). Ο βαθμός σχηματισμού χρώματος από το χρωμογόνο εξαρτάται από την ποσότητα συζεύγματος που βρίσκεται συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος και έτσι είναι ανάλογος προς την αρχική συγκέντρωση των αντίστοιχων αντισωμάτων στο δείγμα ασθενούς.



3 Συστατικά στοιχεία που περιέχονται στο σετ

ΔΙΑΛΥΟΝΤΑΙ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ				
Στοιχείο	Ποσότητα	Χρώμα καπακιού	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / Περιεχόμενο
Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (5x)	1 x 20ml	Λευκό	Κίτρινο	5πλάσια συγκέντρωση Tris, χλωριούχο νάτριο (NaCl), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (50x)	1 X 20ml	Λευκό	Πράσινο	50πλάσια συγκέντρωση Tris, NaCl, Tween 20, οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
ΕΤΟΙΜΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ				
Στοιχείο	Ποσότητα	Χρώμα καπακιού	Χρώμα διαλύματος	Περιγραφή / Περιεχόμενο
Αρνητικός ορός ελέγχου	1 x 1,5ml	Πράσινο	Διαυγές	Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Θετικός ορός ελέγχου	1 x 1,5ml	Κόκκινο	Κίτρινο	Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής	1 x 1,5ml	Μπλε	Κίτρινο	Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Αντιδραστήρια βαθμονόμησης	6 x 1,5ml	Λευκό	Κίτρινο*	Συγκέντρωση κάθε αντιδραστήριου βαθμονόμησης: 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml. Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
Συζεύγματα, IgG	1 x 15ml	Μπλε	Μπλε	Συστατικά στοιχεία: Αντι-ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη σηματοδοτημένη με υπεροξειδάση από ραφανίδα, αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)
Υπόστρωμα TMB	1 x 15ml	Μαύρο	Διαυγές	Σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη και υπεροξειδίου του υδρογόνου (TMB/H ₂ O ₂)
Διάλυμα διακοπής αντίδρασης	1 x 15ml	Λευκό	Διαυγές	1M Υδροχλωρικό οξύ
Πλάκα μικροτιτλοποίησης	12 x 8 ταινίες	Δεν είναι διαθέσιμο	Δεν είναι διαθέσιμο	Με αποσπώμενους υποδοχείς. Ανατρέξτε στην παράγραφο 1 για πληροφορίες σχετικά με την επικάλυψη.
* Η ένταση του χρώματος αυξάνεται με τη συγκέντρωση				
ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ				
Ο αναγνώστης πλακών μικροτιτλοποίησης 450 nm αναγιγνώσκει φίλτρα ανάγνωσης και προαιρετικό 620 nm φίλτρα αναφοράς (600-690 nm). Γυάλινα εξαρτήματα (κύλινδρος 100-1000ml), δοκιμαστικοί σωλήνες για διαλύματα. Δονητής ανάμιξης, προχοϊδες ακρίβειας (10, 100, 200, 500, 1000 μl) ή προσαρμοζόμενη πολυπροχοϊδα (100-1000μl). Συσκευή πλύσης μικροπλάκας (300ml επαναλαμβανόμενη προχοϊδα, ή προχοϊδα πολλαπλών καναλιών ή αυτοματοποιημένο σύστημα), απορροφητικό χαρτί. Οι δοκιμασίες μας έχουν ως σχεδιαστεί για να χρησιμοποιηθούν με καθαρό ύδωρ σύμφωνα με τους ορισμούς της Φαρμακοποιίας Ηνωμένων Πολιτειών (USP 26 - NF 21) και της Ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας (Eur.Ph. 4th ed.).				

4 Φύλαξη και χρόνος διατήρησης

Τα αντιδραστήρια του συνόλου αντιδραστηρίων και η μικροπλάκα πρέπει να φυλάσσονται στους 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F μέσα στους αυθεντικούς περιέκτες. Αραιωμένα διαλύματα, φυλάσσονται στους 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F για ένα μήνα. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις ετικέτες του κάθε συστατικού.

Μη χρησιμοποιείται ληγμένα συστατικά στοιχεία του συνόλου αντιδραστηρίων! Πρέπει να αποφεύγεται η έντονη επίδραση φωτός στο διάλυμα υποστρώματος TMB. Οι μικροπλάκες να φυλάσσονται πάντοτε με ξηραντικό υλικό καλά κλεισμένες μέσα στη μεμβράνη της συσκευασίας.

5 Υποδείξεις και προφυλάξεις

5.1 Επικινδυνότητα για την υγεία

ΑΑΥΤΟ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΕΠΙΤΡΕΠΕΤΑΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΧΡΗΣΗ (IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ).

Πρέπει να χρησιμοποιείται από προσωπικό, το οποίο έχει κατατοπιστεί και εκπαιδευτεί ειδικά στη χρησιμοποίηση in vitro διαγνωστικών υλικών. Αν και αυτό το προϊόν δεν θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό ή επικίνδυνο υπό συνθήκες ενδεδειγμένης χρήσης, συμβουλευτείτε τις παρακάτω πληροφορίες για τη διαφύλαξη της μέγιστης ασφάλειας:

Συστάσεις και μέτρα προφύλαξης

Μεμονωμένα συστατικά του συνόλου αντιδραστηρίων περιέχουν δυνητικά επικίνδυνα αντιδραστήρια, τα οποία είναι δυνατό να προκαλέσουν ερεθισμό των οφθαλμών και του δέρματος. ΠΡΟΣΟΧΗ! Διακριβωτές, έλεγχοι και ρυθμιστικά διαλύματα περιέχουν αζίδιο του νατρίου (NaN_3) ως συντηρητικό. Το NaN_3 μπορεί να είναι τοξικό εάν προληφθεί ή απορροφηθεί από το δέρμα ή τα μάτια. Το NaN_3 μπορεί να αντιδράσει με την εγκατάσταση μολύβδου και χαλκού σχηματίζοντας ιδιαίτερα εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Κατά την απόρριψη, ξεπλύνετε με μεγάλο όγκο ύδατος για να αποτρέψετε τη δημιουργία αζιδίων. Παρακαλώ ανατρέξτε στις διαδικασίες απολύμανσης όπως περιγράφονται από τη CDC ή άλλες τοπικές/εθνικές οδηγίες.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας με το σετ, απαγορεύεται το φαγητό, το ποτό και το κάπνισμα. Μη χρησιμοποιείτε την προχοίδα (πιπέτα) δια μέσω του στόματος, φοράτε γάντια μίας χρήσης.

Τα αντιδραστήρια ανθρώπινης προέλευσης που περιέχονται σε αυτό το προϊόν (οροί ελέγχου και αντιδραστήρια βαθμονόμησης) αποδείχτηκαν κατά τον έλεγχο για ηπατίτιδα Β αντιγόνο επιφάνειας (HbsAg), ηπατίτιδα C και HIV 1 και 2 ως αρνητικά. Όμως, σε προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης δε μπορεί ποτέ να αποκλειστεί πλήρως η πιθανότητα μόλυνσης με τους αναφερόμενους ή και με άλλους ακόμη άγνωστους παθογόνους οργανισμούς. Για τον λόγο αυτό, οι οροί ελέγχου, τα αντιδραστήρια βαθμονόμησης όπως επίσης και οι οροί των ασθενών χαρακτηρίζονται ως δυνητικά μολυσματικοί και πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τα εθνικά νομικά αξιώματα.

Επειδή το kit περιέχει υλικό ζωικής προέλευσης, όπως αναφέρεται στον πίνακα περιεχομένων, πρέπει να το χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της εθνικής νομοθεσίας.

5.2 Γενικές υποδείξεις

Στην περίπτωση κατά την οποία οι πληροφορίες του προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των ετικετών, είναι ελλιπείς ή εσφαλμένες, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή του kit δοκιμής.

Δεν πρέπει να ανταλλάσσονται μεμονωμένα συστατικά διάφορων παρτίδων και εργαλεία της δοκιμασίας, διότι αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

Αφήστε όλα τα συστατικά του σετ να λάβουν θερμοκρασία δωματίου πριν από την έναρξη της δοκιμασίας (20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F) και αναμείξτε καλά. Πρέπει οπωσδήποτε να τηρείται το καθορισμένο πρωτόκολλο για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας.

Επώαση: Συνιστούμε απόδοση δοκιμής στους 30 °C / 86 °F για αυτοματοποιημένα συστήματα.

Μην εκθέτετε ποτέ τα συστατικά του συνόλου αντιδραστηρίων σε θερμοκρασίες άνω των 37 °C / 98,6 °F. Χρησιμοποιείτε για τη λήψη του διαλύματος του υποστρώματος πάντοτε καινούρια – συσκευασμένα ρύγχη για την πιπέτα, για να αποφεύγετε μολύνσεις. Αποφεύγετε την επαφή του διαλύματος υποστρώματος με έντονο φως. Μη χρησιμοποιείτε για το διάλυμα συζεύγματος ποτέ τα ίδια ρύγχη πιπέτας που έχουν έρθει σε επαφή με άλλα αντιδραστήρια.

Η τελική κλινική διάγνωση δεν πρέπει να τίθεται μόνο με βάση τα αποτελέσματα της διεξαγμένης δοκιμασίας, αλλά από τον ιατρό λαμβάνοντας υπόψη όλα τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η διάγνωση πρέπει να επιβεβαιώνεται χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαγνωστικές μεθόδους.

6 Λήψη δείγματος, προετοιμασία και φύλαξη

Συνιστάται η χρήση φρέσκων δειγμάτων ορού. Η λήψη του αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τα εθνικά νομικά αξιώματα. Να μη χρησιμοποιούνται: ικτερικά, λιπαιμικά, αιμολυμένα ή μολυσμένα από βακτήρια δείγματα ορού. Δείγματα ορών που περιέχουν σωματίδια, να τοποθετούνται με χαμηλή ταχύτητα στη συσκευή φυγοκέντρωσης (<1000 x g). Συλλέγετε τα δείγματα αίματος σε καθαρά, στεγνά και κενά φιαλίδια.

Κατόπιν διαχωρισμού τα δείγματα πλάσματος πρέπει να χρησιμοποιηθούν εντός των πρώτων 8 ωρών, διαφορετικά πρέπει να φυλάσσονται κλεισμένα αεροστεγώς στους 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F για 48 ώρες το μέγιστο. Σε περίπτωση που προβλέπεται μεγαλύτερη διάρκεια φύλαξης, τα δείγματα πρέπει να ψύχονται στους - 20 °C / - 4 °F.

7 Διαδικασία της μεθόδου

7.1 Προετοιμασία

Αραίωση συμπυκνωμένων αντιδραστηρίων:

Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων: αραιώνετε 1:5 με αποσταγμένο νερό (π.χ. 20 ml συν 80 ml).

Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης: αραιώνετε 1:50 με αποσταγμένο νερό (π.χ. 20 ml συν 980 ml).

Για την αποφυγή τυχόν λαθών, συνιστάται η σήμανση των καπακιών των διάφορων αντιδραστηρίων βαθμονόμησης.

Αραίωση των δειγμάτων των ασθενών:

Δείγματα ορού: αραιώνετε και αναμειγνύετε 1:101 με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, π.χ. (1x) 1000 μl ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων + 10 μl ορός.

Πλύση:

Απαιτούνται 20 ml αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (1x) ανά 8 βυθίσματα ή 200 ml ανά 96 βυθίσματα π.χ. 4 ml συμπύκνωμα συν 196 ml αποσταγμένο νερό.

Αυτοματοποιημένη πλύση:

Για τη λειτουργία του εργαλείου και το νεκρό όγκο πρέπει να ληφθούν υπόψη πρόσθετες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης

Χειροκίνητη πλύση:

Απομακρύνετε το υγρό χτυπώντας την πλάκα επάνω σε ένα απορροφητικό χαρτί. Βάζετε 300 μl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης σε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας την πιπέτα, περιμένετε 20 δευτερόλεπτα. Επαναλάβετε τη διαδικασία ακόμη δύο φορές.

Μικροπλάκες:

Απομακρύνετε τα βυθίσματα που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί και φυλάσσετε τα με ξηραντικό υλικό καλά κλεισμένα μέσα στη μεμβράνη της συσκευασίας σε δροσερό μέρος (2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F).

7.2 Σχήμα διανομής αντιδραστηρίων

Προτείνουμε τη χρήση της πιπέτας για αντιδραστήρια βαθμονόμησης, ορούς ελέγχου και δείγματα ως εξής:

Για ΠΟΣΟΤΙΚΗ ερμηνεία					Για ΠΟΙΟΤΙΚΗ ερμηνεία				
	1	2	3	4..		1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1		A	NC	P2		
B	Cal A	Cal E	P1		B	NC	P2		
C	Cal B	Cal F	P2		C	CC	P3		
D	Cal B	Cal F	P2		D	CC	P3		
E	Cal C	PC	P3		E	PC	...		
F	Cal C	PC	P3		F	PC	...		
G	Cal D	NC	...		G	P1	...		
H	Cal D	NC	...		H	P1	...		

CalA: calibrator A

CalB: calibrator B

CalC: calibrator C

CalD: calibrator D

CalE: calibrator E

CalF: calibrator F

PC: positive control

NC: negative control

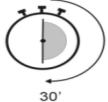
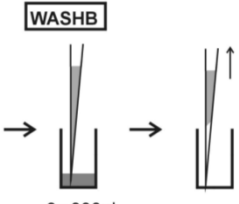
CC: cut-off calibrator

P1: patient 1

P2: patient 2

P3: patient 3

7.3 Βήματα εργασίας

Βήμα	Περιγραφή
1.	Πριν από το πιπετάρισμα βεβαιωθείτε ότι έχετε εκτελέσει τη διαδικασία προετοιμασίας από το βήμα 7.1 παραπάνω.
2.	Ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα ανάλογα με τα επιθυμητά αποτελέσματα ποιοτικής/ποσοτικής ερμηνείας:
ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
3.	Βάζετε στα προβλεπόμενα βυθίσματα 100 μl από ένα από τα παρακάτω υλικά χρησιμοποιώντας την πιπέτα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2 παραπάνω: - Αντιδραστήρια βαθμονόμησης (CAL.A έως CAL.F) για ΠΟΣΟΤΙΚΗ ερμηνεία ή - Αντιδραστήριο βαθμονόμησης οριακής τιμής (CC) για ΠΟΙΟΤΙΚΗ ερμηνεία Επίσης, βάζετε από 100 μl από καθένα από τα παρακάτω: - Αρνητικός ορός ελέγχου (NC) και θετικός ορός ελέγχου (PC) καθώς και - Διαλυμένο ορό ασθενών (P1, P2...)
4.	 Επωάζετε για 30 λεπτά σε 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F.
5.	 Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).

ΣΥΖΕΥΓΜΑ

6.



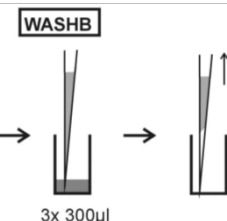
Βάζετε 100 μl διαλύματος συζεύγματος σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας πιπέτα.

7.



Επώάζετε για 30 λεπτά σε 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F

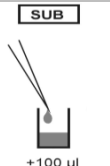
8.



Πλένετε 3 φορές, κάθε φορά με 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (αραιωμένο 1:50).

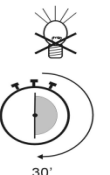
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

9.



Βάζετε 100 μl διαλύματος υποστρώματος TMB σε κάθε υποδοχέα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.

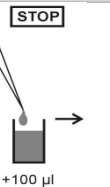
10.



Επώάζετε για 30 λεπτά σε 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F. Προστατεύστε από το έντονο φως.

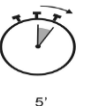
ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΚΟΠΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

11.



Βάζετε 100 μl διαλύματος διακοπής αντίδρασης σε κάθε βύθισμα με τη σειρά που τοποθετήθηκε το υπόστρωμα χρησιμοποιώντας την πιπέτα.

12.

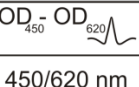


Επώάζετε για 5 λεπτά τουλάχιστον.

13.

Ανακινείτε προσεκτικά την πλάκα για 5 δευτερόλεπτα.

14.



Μετρήστε την απορρόφηση στα 450 nm εντός 30 λεπτών (συνιστάται προαιρετικά και στα 450/620 nm).

8 Ποσοτική και ποιοτική ερμηνεία

Ο **ποσοτικός προσδιορισμός** επιτυγχάνεται βάσει μίας πρότυπης καμπύλης, στην οποία μεταφέρεται η οπτική πυκνότητα των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης (άξονας ψ) έναντι της συγκέντρωσης σε U/ml (άξονας x). Για τον καλύτερο προσδιορισμό συνιστάται η μεταφορά log/lin και ένα Fit 4 παραμέτρων. Με βάση την καμπύλη εξακριβώνεται από την οπτική πυκνότητα του δείγματος η συγκέντρωση των αντισωμάτων σε U/ml.

Περιοχή φυσιολογικών τιμών	Απροσδιόριστα	Θετικά αποτελέσματα
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

Παράδειγμα προσδιορισμού

Αυτό το παράδειγμα δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ασθενών.

Αντιδραστήρια βαθμονόμησης IgG	OD 450/620 nm	CV % (Διακύμανση)
0 U/ml	0.039	0,0
3 U/ml	0.135	1,1
10 U/ml	0.313	3,2
30 U/ml	0.552	3,6
100 U/ml	1.187	3,5
300 U/ml	2.031	3,2

Παράδειγμα υπολογισμού

Ασθενής	Επανάληψη (OD)	Μέσος όρος (OD)	Αποτέλεσμα (U/ml)
P 01	1,017/1,029	1.023	85,6
P 02	0,498/0,494	0.496	29,4

Τα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από το μέγιστο εύρος τιμών των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης πρέπει να αναφέρονται ως ">Μέγ." Πρέπει να αραιώνονται κατάλληλα και να δοκιμάζονται ξανά. Τα δείγματα με τιμές μικρότερες από το εύρος τιμών των αντιδραστηρίων βαθμονόμησης πρέπει να αναφέρονται ως "<Ελάχ."

Ειδικά στοιχεία της παρτίδας, αναγράφονται στο συναπτόμενο πιστοποιητικό ελέγχου. Ιατρικά εργαστήρια μπορούν να διεξάγουν ελέγχους ποιότητας στο χώρο τους με δικούς τους ελέγχους και/ ή ορούς από την τράπεζα αίματος σύμφωνα με της ρυθμίσεις της Ε.Ε..

Συνιστάται σε κάθε εργαστήριο να δημιουργήσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές, βασισμένες στη δική του τεχνική, ελέγχους, εξοπλισμό και πληθυσμούς ασθενών.

Στην περίπτωση κατά την οποία οι τιμές των ορών ελέγχου δεν συμφωνούν με τα κριτήρια, η δοκιμή είναι άκυρη και θα πρέπει να επαναληφθεί.

Θα πρέπει να ελεγχθούν τα παρακάτω τεχνικά ζητήματα: Ημερομηνίες λήξης των αντιδραστηρίων (που προετοιμάστηκαν), συνθήκες αποθήκευσης, πιπέτες, συσκευές, φωτόμετρο, συνθήκες επώασης και μέθοδος πλύσης.

Εάν τα στοιχεία τα οποία υποβλήθηκαν σε δοκιμή παρουσιάζουν απόκλιση ή άλλου είδους διαφοροποίηση από τις αναμενόμενες τιμές ή εάν δεν πληρούνται τα κριτήρια εγκυρότητας χωρίς εύλογη αιτία, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή του kit δοκιμής.

Για **ποιοτική αξιολόγηση** διαβάστε την οπτική πυκνότητα του μάρτυρα αποκοπής (cut-off calibrator) και την αντίστοιχη των δειγμάτων ασθενών. Συγκρίνετε την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων με αυτή του μάρτυρα. Για την ποιοτική αξιολόγηση προτείνεται να θεωρούνται τα δείγματα 20% γύρω από την τιμή του μάρτυρα σαν απροσδιόριστα. Όλα τα δείγματα με υψηλότερες τιμές θεωρούνται θετικά, δείγματα με χαμηλότερες τιμές αρνητικά.

Αρνητικό:	OD ασθενή	<	0.8 x OD _{cut-off}
Απροσδιόριστα:	0.8 x OD _{cut-off}	≤	OD _{ασθενή} ≤ 1.2 x OD _{cut-off}
Θετικό:	OD ασθενή	>	1.2 x OD _{cut-off}

9 Τεχνικά στοιχεία

Υλικό δειγμάτων:	Ορός
Όγκος δειγμάτων:	10 μl ορός για αραιώση 1:101 με 1x ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
Ολικός χρόνος επώασης:	90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 20 - 32 °C / 68 - 89,6 °F
Περιοχή μέτρησης:	0-300 U/ml
Αναλυτική Ευαισθησία:	1,83 U/ml
Εύρος αναφοράς:	2,09 – 300 U/ml
Φύλαξη:	σε 2 - 8 °C / 35,6 - 46,4 °F στις αυθεντικές φιάλες
Αριθμός των προσδιορισμών:	96 δοκιμασίες

10 Στοιχεία Απόδοσης

10.1 Αναλυτική Ευαισθησία

Ο έλεγχος του ρυθμιστικού διαλύματος 62 φορές σε **AESKULISA® DGP-G** απέδωσε ένα όριο τυφλού δείγματος 0,3 U/ml και 8 χαμηλά αρνητικά δείγματα για 8 φορές απέδωσαν όριο ανίχνευσης 1,83 U/ml.

10.2 Σύγκριση μεθόδων

Οι μικροπλάκες είναι επιστρωμένες με συνθετικά, αποαμινωμένα πεπτιδία παράγωγα της γλιαδίνης. Δεν διαπιστώθηκε καμία διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα αντισώματα.

Ελέγχθηκαν συνολικά 218 δείγματα ενηλίκων και παιδιατρικά δείγματα (σχετικά με τη σύνθεση βλ. πίνακα) στο **AESKULISA® DGP-G** και σε μια συσκευή του εμπορίου που αντιδρά στο εύρος αναφοράς. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (τα δείγματα εκτός του εύρους αναφοράς αποκλείστηκαν από τη σύγκριση αλλά συμπεριλήφθηκαν στην κλινική επαλήθευση παρακάτω):

DGP-G	AESKU	Συσκευή του εμπορίου	
Διάγνωση	ΘΕΤ. (>18)	ΘΕΤ.	Σύνολο
CD	62 (93,9%)	59 (89,4%)	66
CD έλλ. IgA	15 (100%)	15 (100%)	15
CD ύποπτο	30 (81,1%)	31 (83,8%)	37
CD ύποπτο έλλ. IgA	0 (0%)	0 (0%)	2
DH	39 (86,7%)	38 (84,4%)	45
Μάρτυρες (όχι DH/CD)	3 (5,7%)	1 (1,9%)	53
Σύνολο	149 (68,3%)	144 (66,1%)	218

DGP-G		Συσκευή του εμπορίου		
		ΘΕΤ. (>20)	ΑΡΝ. (≤20)	Σύνολο
AESKU	ΘΕΤ. (>18)	136	13	149
	ΑΡΝ. (≤18)	8	61	69
	Σύνολο	144	74	218

Θετική ταύτιση	95% C.I.	
94,44% (136/144)	89,42%	97,16%
Αρνητική ταύτιση		
82,43% (61/74)	72,23%	89,44%
Συνολική ταύτιση		
90,37% ((136+61)/218)	85,72%	93,61%

(*) Οι ταυτίσεις υπολογίσθηκαν με τα διαφορούμενα αποτελέσματα αξιολογούμενα ως αρνητικά και τα χαμηλά θετικά αποτελέσματα αξιολογούμενα ως θετικά.

Από τα 21 δείγματα με αποκλίνοντα αποτελέσματα το **AESKULISA®** υπερτερεί της συσκευής του εμπορίου σε 11 περιπτώσεις με βάση πρόσθετες πληροφορίες, όπως, π.χ., EMA, βιοψία και αποτελέσματα δοκιμασιών DGP για άλλες κατηγορίες ανοσοσφαιρινών.

10.3 Κλινική αξιολόγηση

Η διαγνωστική ευαισθησία 93,8% και η διαγνωστική ειδικότητα 97,3% υπολογίσθηκαν με τα παραπάνω δείγματα CD και DH, όχι DH/CD και αυτοάνοσων μαρτύρων αγνοώντας τα αποτελέσματα για τα ύποπτα δείγματα και τους υγιείς μάρτυρες (σχετική με τη σύνθεση βλ. παρακάτω πίνακα).

DGP-G	AESKU	
Ομάδα νόσων	ΘΕΤ. (>18)	Σύνολο
Αυτοάνοσοι μάρτυρες*	0(0%)	54
CD	75(94,9%)	79
CD έλλ. IgA	16(100%)	16
DH	59(90,8%)	65
Μάρτυρες (όχι DH/CD)	3(5,4%)	56
Σύνολο		270

(*) περιλαμβάνει πρόσθετα δείγματα που προσδιορίσθηκαν μόνο στο Aeskulisa και όχι στη συσκευή του εμπορίου, καθώς και δείγματα υψηλά θετικά εκτός του προσδιοριζόμενου εύρους.

DGP-G	Διάγνωση		
Δοκιμασία	ΘΕΤ.	ΑΡΝ.	Σύνολο
ΘΕΤ.>18	150	3	153
ΑΡΝ.≤18	10	107	117
Σύνολο	160	110	270

Διαγνωστική ευαισθησία*	95% C.I.	
93,75% (150/160)	88,88%	96,57%
Διαγνωστική ειδικότητα*		
97,27% (107/110)	92,29%	99,07%

*τα διαφορούμενα αποτελέσματα θεωρούνται ως αρνητικά

10.4 Γραμμικότητα

Οι επιλεγμένοι οροί ελέγχθηκαν με αυτό το σετ και διαπιστώθηκε ότι αραιώνονται γραμμικά με αρνητικό ορό κατά CLSI EP06-A. Ωστόσο, λόγω της ετερογενούς φύσης των ανθρώπινων αντισωμάτων, ενδέχεται να υπάρχουν δείγματα που δεν τηρούν αυτόν τον κανόνα.

Σύνθεση		Υψηλή			Μέση			Χαμηλή		
Θετ. δείγμα	Αρν. δείγμα	Μέσος όρος [U/ml]	Αναμενόμενη τιμή [U/ml]	Ανάκτηση [%]	Μέσος όρος [U/ml]	Αναμενόμενη τιμή [U/ml]	Ανάκτηση [%]	Μέσος όρος [U/ml]	Αναμενόμενη τιμή [U/ml]	Ανάκτηση [%]
100,0%	0,0%	313,9	313,9	100,0%	119,2	119,2	100,0%	16,7	16,7	100,0%
87,5%	12,5%	264,1	274,7	96,1%	100,8	104,3	96,7%	15,8	14,6	108,2%
75,0%	25,0%	243,3	235,4	103,3%	91,9	89,4	102,8%	12,4	12,5	98,7%
67,5%	32,5%	199,8	211,9	94,3%	76,0	80,4	94,4%	9,8	11,3	86,5%
50,0%	50,0%	162,5	157,0	103,5%	52,6	59,6	88,2%	8,0	8,4	95,6%
37,5%	62,5%	106,4	117,7	90,4%	46,0	44,7	103,0%	6,7	6,3	107,5%
25,0%	75,0%	84,1	78,5	107,2%	24,5	29,8	82,1%	3,0	4,2	71,1%
12,5%	87,5%	42,3	39,2	107,8%	13,7	14,9	91,6%	1,2	2,1	58,0%

Με αυτά τα δεδομένα, το γραμμικό εύρος για το **AESKULISA® DGP-G** είναι 2,09 U/ml - 300 U/ml.

10.5 Ακρίβεια

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας της δοκιμασίας αξιολογήθηκε η μεταβλητότητα (εντός της ίδιας δοκιμασίας, μεταξύ διαφορετικών δοκιμασιών και μεταξύ παρτίδων) με εξέταση της επαναληψιμότητας σε πέντε δείγματα ορού που επιλέχθηκαν ώστε να καλύπτουν ένα εύρος της πρότυπης καμπύλης, σε 8 επαναλήψεις και 5 δοκιμασίες. Η μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων αξιολογήθηκε με μέτρηση πέντε δειγμάτων ορού σε 8 επαναλήψεις 3 διαφορετικών παρτίδων.

Μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών δοκιμασιών			Μεταβλητότητα εντός της ίδιας δοκιμασίας			Μεταβλητότητα μεταξύ παρτίδων		
Αριθ. δείγματος	Μέσος όρος (U/ml)	CV (%)	Αριθ. δείγματος	Μέσος όρος (U/ml)	CV (%)	Αριθ. δείγματος	Μέσος όρος (U/ml)	CV (%)
1	3,24	21,5	1	3,24	11,3	1	2,67	7,6
2	12,1	14,8	2	12,1	10,4	2	11,5	12,4
2b	19,5	10,0	2b	19,5	9,0	-	-	-
3	24,3	13,0	3	24,3	11,7	3	22,4	9,1
4	86,2	10,8	4	86,2	9,3	4	79,8	7,2
5	256,9	11,8	5	256,9	8,5	5	265,6	8,6

Τα κριτήρια αποδοχής είναι ≤15% για τα θετικά δείγματα, ≤15% για τα διαφορούμενα δείγματα και ≤25% για τα αρνητικά δείγματα

10.6 Διακρίβωση

Το ποσοτικό σύστημα μέτρησης λόγω έλλειψης ενός διεθνούς πρότυπου αναφοράς έχει διακριβωθεί με προσωρινές μονάδες μέτρησης. Τα αποτελέσματα δίδονται σε U/ml.

10.7 Κανονικό εύρος

Τα αντισώματα DGP-G αναφέρονται σε ποσοστό έως 13,7% του κανονικού πληθυσμού.

133 τυχαίοι αιμοδότες ελέγχθηκαν για αντισώματα DGP-G. Από αυτούς; οι 116 ήταν ηλικίας 16-45 ετών και 17 ήταν 46 ετών και άνω. Ο αριθμός των ανδρών και των γυναικών ήταν παρόμοιος. Ένα δείγμα ήταν θετικό (0,8%) με τιμή 18,2 μονάδων, ενώ τα υπόλοιπα ήταν αρνητικά. Η μέση τιμή των δειγμάτων ήταν 3,2 μονάδες με τυπική απόκλιση 2,2 μονάδων. Η μέση τιμή ήταν 6,9 τυπικές αποκλίσεις κάτω του ορίου 18 μονάδων της θετικότητας.

11 Βιβλιογραφία

- Schwartz E, et al.:** Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clinical Chemistry* 50: 2370-5, 2004.
- Osman AA, et al.:** B-Cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol* 121: 248-254, 2000.
- Mothes T.:** Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies. *Adv Clin Chem.* 44: 35-63, 2007
- Aleanzi M, et al.:** Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clinical Chemistry* 47: 2023-8, 2001.
- Richter T, et al.;** Determination of IgG and IgA antibodies against native gliadin is not helpful for the diagnosis of coeliac disease in children up to 2 years old. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 55: 21-5, 2012
- Leffler DA, Schuppan D.:** Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 105: 2520-4, 2010.
- Kurppa K, et al.:** Antibodies against deamidated gliadin peptides in early-stage celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 45: 673-8, 2011.
- Vermeersch P, et al.:** Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. *Clin Chim Acta.* 411: 931-5, 2010
- Prause C, et al.:** Antibodies against deamidated gliadin as new and accurate biomarkers of childhood coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 49: 52-8, 2009
- Naiyer AJ, et al.:** Comparison of commercially available serologic kits for the detection of celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 43: 225-32, 2009
- Fasano, A.** Surprises from Celiac Disease. *Scientific American.* 2009
- Ivarsson, A., et al.:** Breast-feeding protects against celiac disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 75, 914–921, 2002
- Lagerqvist, C., et al.:** Antigliadin immunoglobulin A best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 47, 428–435. 2008
- Liu, E. et al.:** Natural history of antibodies to deamidated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 45, 293–300. 2007
- Losowsky, M.S.** A history of coeliac disease. *Dig.Dis.* 26, 112–120. 2008
- Maglio, M. et al.:** . Serum and intestinal celiac disease-associated antibodies in children with celiac disease younger than 2 years of age. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 50, 43–48. 2010
- Not, T. et al.:** Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *ScandJ Gastroenterol* 33, 494–498. 1998
- Salmi, T.T., et al.:** Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut* 55, 1746–1753. 2006
- Schuppan, D., et al.:** Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 137, 1912–1933. 2009
- Vermeersch, P. et al.** Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. *Clin.Chim.Acta* 411, 931–935. 2010

12 Ρυθμιστικά σύμβολα

IVD	- Diagnosi in vitro - Pour diagnostic in vitro - In Vitro Diagnostikum - Para uso Diagnóstico in vitro	- For in vitro diagnostic use - Para uso diagnóstico in vitro - In Vitro Διαγνωστικό μέσο
REF	- Numero d'ordine - Référence Catalogue - Bestellnummer - Número de catálogo	- Catalogue number - Numéro de catálogo - Αριθμός παραγγελίας
LOT	- Descrizione lotto - Lot - Chargen Bezeichnung - Lote	- Lot - Lote - Χαρακτηρισμός παρτίδας
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo - Identifiant unique de l'appareil - eindeutige Produktidentifizierung - Identificador único do dispositivo	- Unique Device Identifier - Identificador único del dispositivo - Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
CE	- Conformità europea - Déclaration CE de Conformité - Europäische Konformität - Declaração CE de Conformidade	- EC Declaration of Conformity - Declaración CE de Conformidad - Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- 96 determinazioni - 96 tests - 96 Bestimmungen - 96 Testes	- 96 tests - 96 pruebas - 96 προσδιορισμοί
	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso - Voir les instructions d'utilisation électronique - Elektronische Gebrauchsanweisung beachten - Seguir as instruções electrónicas de utilização	- See electrical instructions for use - Sigue las instrucciones electrónicas de uso - Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Da utilizzarsi entro - Utilise avant le - Verwendbar bis - Utilizar antes de	- Use by - Utilizar antes de - Χρήση μέχρι
	- Conservare a 2-8°C (35,6-46,4°F) - Conserver à 2-8°C (35,6-46,4°F) - Lagerung bei 2-8°C (35,6-46,4°F) - Conservar entre 2-8°C (35,6-46,4°F)	- Store at 2-8°C (35,6-46,4°F) - Conserver a 2-8°C (35,6-46,4°F) - Φυλάσσεται στους 2-8°C (35,6-46,4°F)
	- Prodotto da - Fabriqué par - Hergestellt von - Fabricado por	- Manufactured by - Fabricado por - Κατασκευάζεται από
CO-CAL	- Calibratore cut-off - Etalon Seuil - Grenzwert Kalibrator - Calibrador de cut-off	- Cut off Calibrator - Calibrador de cut-off - Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
CON +	- Controllo positivo - Contrôle Positif - Positiv Kontrolle - Controllo positivo	- Positive Control - Control Positivo - Θετικός ορός ελέγχου
CON -	- Controllo negativo - Contrôle Négatif - Negativ Kontrolle - Controllo negativo	- Negative Control - Control Negativo - Αρνητικός ορός ελέγχου
CAL	- Calibratore - Etalon - Kalibrator - Calibrador	- Calibrator - Calibrador - Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
CONJ	- Coniugato - Conjugué - Konjugat - Conjugado	- Conjugate - Conjugado - Σύζευγμα
MP	- Micropiastro rivestita - Microplaque sensibilisée - Beschichtete Mikrotiterplatte - Microplaca revestida	- Coated microtiter plate - Microplaca sensibilizada - Επικαλυμμένη μικροτίτλινάκι
WASHB 50x	- Tampone di lavaggio - Tampon de Lavage - Waschpuffer - Solução de lavagem	- Wash buffer - Solución de lavado - Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
SUB	- Tampone substrato - Substrat - Substratpuffer - Subtrato	- Substrate buffer - Tampón sustrato - Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP	- Reagente bloccante - Solution d'Arrêt - Stopreagenz - Solução de paragem	- Stop solution - Solución de parada - Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
SB 5x	- Tampone campione - Tampon Echallillons - Probenpuffer - Diluente de amostra	- Sample buffer - Tampón Muestras - Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων